

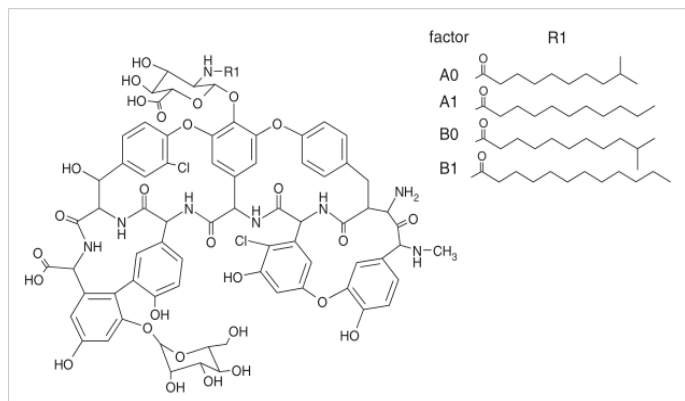
达巴万星发酵液处理条件的优化

李文浩（丽珠集团新北江制药股份有限公司，广东 清远 511515）

摘要：本文主要对达巴万星发酵液不同处理条件进行了优化，得出发酵液最佳处理条件：pH 调到 12.0-12.1，超声 30min，8500rpm 离心 15min。

关键词：达巴万星；发酵液；样品处理；效价

达巴万星（Dalbavancin）中间体 A40926 是 1984 年科学家在培养分离来自土壤的马杜拉放线菌属菌种（*Actinomadura*）时发现的一种糖肽类物质。2003 年将 A40926 的产生菌归类于野野村氏菌属放线菌 ATCC 39727（*Nonomuraea* sp ATCC 39727）。A40926 包括 5 个主要组份：PA、PB、A、B0 和 B1，其中 B0 和 B1 统称为 B 组份。A40926B 组份经过化学结构修饰后可得到一种新型糖肽类抗菌药物达巴万星^[1]。达巴万星在治疗导管相关的血源性感染以及皮肤和软组织感染方面已取得了良好的效果，因其具有优良的体内抗菌活性和安全性，在对抗各种细菌菌株方面比万古霉素显示出更大的功效，并由于长半衰期和无剂量限制性副反应，达巴万星具有较万古霉素更为简便的给药方案，被设计用作万古霉素的改进型代替药物^[2]。



达巴万星分子式

A、B 和 PA、PB 的区别在于甘露糖 C-6 位上的乙酰基。发酵液中 PA、PB 含量占优，但在纯化过程中，长时间在碱性环境中温育时，PA、PB 会慢慢转化为 A、B^[3]。偶然发现发酵液进行不同条件处理时，测得的效价有差异。因此本文通过对达巴万星发酵液处理条件进行单因素试验，目的是进一步优化发酵液处理条件。

1 材料与设备

1.1 菌株

编号 20405-DM1#，菌种实验室保存。

1.2 原材料

麦芽糊精、玉米淀粉、蔗糖、葡萄糖、花生饼粉、

酵母粉、L-缬氨酸、轻质碳酸钙、乙腈、甲醇、氢氧化钠。

1.3 设备

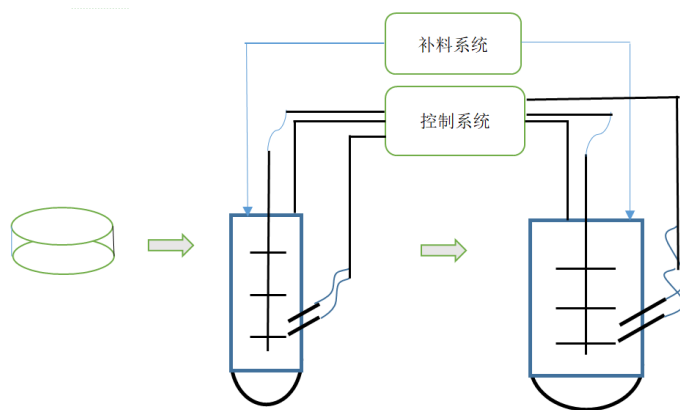
数显恒温水浴锅 DK-8D；超声波清洗机 JP-040S；METTER TOLEDO Fiveeasy Plus；100L 发酵罐及控制系统；安捷伦高效液相色谱及相关系统。

2 试验方法

通过将孢子接到斜面培养基进行培养，然后接入 50L 罐进行种子培养，再移入 100L 罐进行发酵培养。培养周期 140h。原始工艺为：用浓氢氧化钠溶液将 pH 调到 10.5-11.0，60℃ 水浴 60min，超声 30min，8500rpm 离心 15min。

本试验取 100 h 发酵液进行处理，对 pH、水浴、超声时间、离心转速单因素试验，

本实验使用安捷伦高效液相色谱仪，对达巴万星发酵液进行效价测定。色谱柱 Cosmosil C₁₈，波长 210nm，进样量 10μL。通过效价测定、对比，从而找到最优处理条件。为后续试验奠定基础。



100L 罐发酵系统流程图

3 试验流程及结果

原始工艺为 pH 调到 10.5-11.0，60℃ 水浴 60min，超声 30min。用此方法处理样品（1.1）作为对照。对照与试验都为三个试样。每次试验都参考上次试验结果，采用最优试验条件。

3.1 水浴的影响

① pH 调到 10.7，60℃ 水浴 60min，超声 30min，

8500 转离心 15min; ② pH 调到 10.7, 超声 30min, 8500 转离心 15min。

试验项目	编号	60℃ 水浴	pH	离心转速	超声	效价
水浴的影响	1.1	60min	10.76	8500r/15min	30min	813.57
		60min	10.70	8500r/15min	30min	812.81
		60min	10.71	8500r/15min	30min	813.05
	1.2	-	10.76	8500r/15min	30min	919.50
		-	10.70	8500r/15min	30min	918.75
		-	10.71	8500r/15min	30min	919.69

由上表可以得出发酵液未经水浴效价反而高, 有可能在水浴过程中部分物质发生了解析。

3.2 pH 的影响

- ① pH 调到 12.0, 超声 30min, 8500 转离心 15min;
② pH 调到 13.0, 超声 30min, 8500 转离心 15min。

试验项目	编号	pH	离心转速	超声	效价
pH	2.1	12.11	8500r/15min	30min	961.67
		12.05	8500r/15min	30min	961.53
		11.97	8500r/15min	30min	961.47
	2.2	13.15	8500r/15min	30min	795.33
		13.05	8500r/15min	30min	799.99
		13.17	8500r/15min	30min	798.15

去除水浴后, 通过上表试验结果可以发现, 用浓氢氧化钠将 pH 调到 12.05、12.11 效价更优。

3.3 离心转速的影响

试验项目	编号	pH	离心转速	超声	效价
离心转速	3.1	12.05	3000r/15min	30min	960.58
	3.2	12.05	4500r/15min	30min	960.93
	3.3	12.05	6000r/15min	30min	961.10

- ① pH 调到 12.0, 超声 30min, 3000 转离心 15min;
② pH 调到 12.0, 超声 30min, 4500 转离心 15min;
③ pH 调到 12.0, 超声 30min, 6000 转离心 15min。

去除水浴后, pH 调到 12.05, 不同离心转速, 处理后的发酵液效价基本相同, 说明离心条件对效价影响较小, 只要做到把上清液分离即可。

3.4 超声的影响

- ① pH 调到 12.0, 超声 60min, 8500 转离心 15min;
② pH 调到 12.0, 超声 90min, 8500 转离心 15min;
③ pH 调到 12.0, 超声 120min, 8500 转离心 15min;
④ pH 调到 12.0, 超声 150min, 8500 转离心 15min。

试验项目	编号	pH	离心转速	超声	效价
超声时间	4.1	12.11	8500r/15min	60min	960.67
	4.2	12.11	8500r/15min	90min	958.31
	4.3	12.11	8500r/15min	120min	958.56
	4.4	12.11	8500r/15min	150min	895.23

由上表看出, 超声时间对发酵液效价影响不明显, 超声 150min 发酵液效价有下降趋势, 考虑到试验效率和试验成本, 最终选择超声时间为 30min。

4 分析

通过试验可以看出, 水浴可能会使单位降低, 部分物质分解; pH 对料液处理结果影响最明显, 而 pH 在 12.0~12.1 之间处理效果比较好; 离心转速对效价影响不明显; 超声时间越长, 效价反而会降低。最终把样品处理条件定为: 用浓氢氧化钠将 pH 调到 12.0~12.1, 超声 30min, 8500 转离心 15min。此试验节省了水浴时间, 提高了效率, 对后续发酵优化及放大有意义。试验过程中也发现温度对发酵液单位由于时间有限和公司成本因素, 本试验只对单影响因素进行了探讨, 而更深层次的影响机理还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 一种 A40926 的发酵工艺 [M]. 上海: 上海医药工业研究院, 2012-10-01.
- [2] 常亮, 魏增辉, 李敏娜, 仲伟潭. 新型糖肽类抗生素达巴万星 [J]. 煤炭与化工, 2013, 36(07): 40-41.
- [3] 沈晓放, 陈少欣. 半合成糖肽类抗生素达巴万星前体 A40926 的生物合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(02): 141-147.

作者简介:

李文浩 (1992.02-), 男, 民族: 汉, 籍贯: 甘肃华亭, 学历: 本科。